

# Pahanlaatuisten eturauhassolujen tunnistusmenetelmän kehittäminen soluviljelytekniikoita käyttäen

Unna Leinonen  
Syventävien opintojen kirjallinen työ  
Tampereen yliopisto  
Lääketieteen yksikkö  
Dosentti Oksalan ryhmä  
Elokuu 2015

Tampereen yliopisto  
Lääketieteen yksikkö  
Kirurgian apulaisprofessori Oksalan tutkimusryhmä

Unna Leinonen: Pahanlaatuisten eturauhassolujen tunnistusmenetelmän  
kehittäminen soluviljelytekniikoita käyttäen

Kirjallinen työ, 24 sivua  
Ohjaajat: Kir. ap. prof. Niku Oksala ja LT Antti Roine

Elokuu 2015

Avainsanat: polyamiinit, spermiini, DENSpm, keinonenä, eturauhassyöpä

Polyamiinit ovat ryhmä ornitiinista lähtöisin olevia haihtuvia molekyylejä. Aitotumallisten solujen yleisimmät polyamiinit ovat putreskiini, spermiidiini ja spermiini. Ne ovat välttämättömiä solun normaalille kasvuille ja toiminnalle. Niiden monimutkainen metabolia ja määrän tiukka säätely viittaavat siihen, että polyamiinit ovat elintärkeitä solun elossa pysymiselle. Poikkeamat polyamiinimetabolian säätelyssä voivat johtaa useisiin sairauksiin.

Eturauhassyöpä on suomalaisten miesten yleisin syöpä. Suomen syöpärekisterin mukaan vuonna 2013 uusia eturauhassyöpiä todettiin 5043, mikä vastaa 30.7 % kaikista uusista miesten syövistä. Ennuste eturauhassyövästä parantumiselle on parempi kuin monissa muissa syövässä. Taudin aikainen toteaminen parantaa ennustetta huomattavasti. PSA, prostataspesifinen antigeeni, on yleisesti käytössä oleva merkkiaine. PSA ei kuitenkaan erota hyväennusteista hitaasti etenevää syöpää aggressiivisesta taudinkuvasta.

Tämän tutkimuksen tarkoituksena on kehittää elektroniseen nenään perustuvaa teknologiaa pahanlaatuisten eturauhassolujen tunnistamiseksi soluviljelytekniikoita käyttäen.

Tutkimuksessa hajuja analysoitiin Environics Oy:n valmistamalla ChemPro 100 – kaasuanalyysaattorilla ja tutkimusryhmämme kehittämällä näytteenottojärjestelmällä. Aineiston perusteella selvitettiin, eroavatko DENSpm-solusalpajalla käsiteltyjen eturauhassyöpäsolujen ja hyvänlaatuisten eturauhassolujen hajut toisistaan. Tämä polyamiinianalogi pumppaa solusta ulos polyamiineja. Mikäli keinonenä tunnistaa solulinjojen eroavaisuuden lisääntyneen, voisi se viitata polyamiinien olevan syövän hajun lähteenä.

Saatujen tulosten perusteella DENSpm näyttää vaikuttavan pahanlaatuisen eturauhassolulinjan aineenvaihduntaan, mikä heijastuu solujen hajuun. Mediumin haju ei kuitenkaan muutu.

Tämä viittaa siihen, että DENSpm:n polyamiinien ulospumppausta aiheuttava vaikutus ei ole suoraan hajumuutoksen takana ja näin ollen polyamiinit eivät tällä perusteella keskeisesti selitä solulinjojen hajueroa. DENSpm:n lisäys muuttaa LNCaP:n, muttei EP-156T:n hajua.

Tämän tutkimuksen tulokset eivät tue polyamiinien roolia ”syövän hajua” selittävinä molekyyleinä soluviljelyolosuhteissa.

# SISÄLLYSLUETTELO

<b>1. Polyamiinit</b>	
1.1 Rakenne	1
1.2. Polyamiinien rooli normaalissa solun aineenvaihdunnassa	2
1.3 Polyamiiniaineenvaihdunta syövässä	4
1.4. DENSp <sub>m</sub> , sen rooli onkologiassa	5
<b>2. Elektroniset nenät</b>	
2.1. Toimintaperiaate	6
2.2. Sovellukset syöpädiagnostiikassa	8
<b>3. Tutkimushypoteesit</b>	9
<b>4. Aineisto ja menetelmät</b>	
4.1. Soluviljelmät	10
4.2 ChemPro 100	11
4.3. Mittausjärjestely	11
<b>5. Tulokset</b>	12
<b>6. Pohdinta</b>	23
<b>7. Johtopäätökset</b>	24
<b>8. Lähteet</b>	25

# 1. Polyamiinit

## 1.1 Rakenne

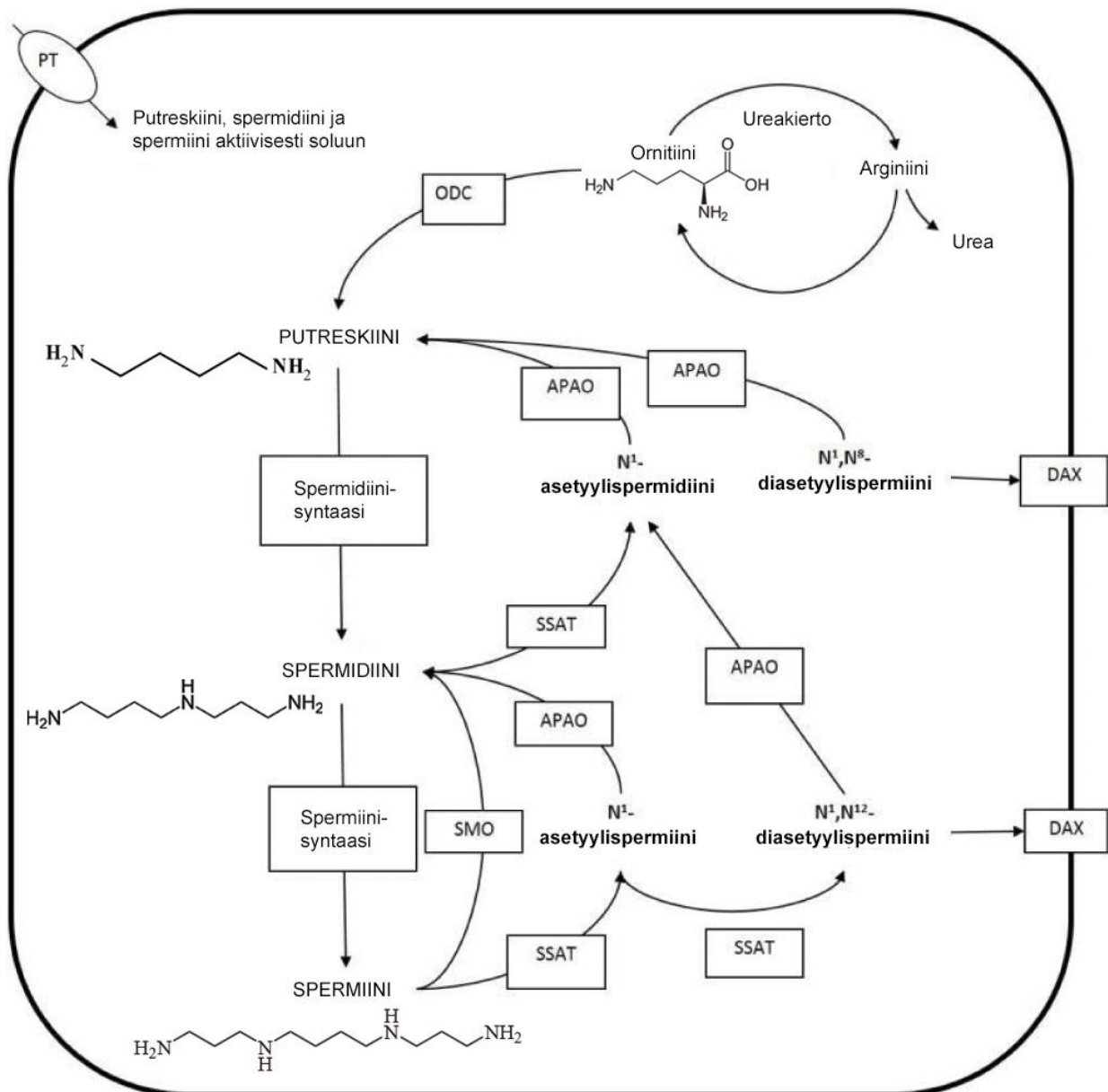
Polyamiinit ovat kaikissa soluissa esiintyviä orgaanisia yhdisteitä, joilla on solun toiminnassa vaihtelevat roolit. Ne ovat vesiliukoisia, alifaattisia kationeja, joilla on ainakin kaksi aminoryhmää ( $-NH_2$ ). Elimistön pH:ssa polyamiinit ovat täysin protonisoituneissa muodoissaan (keskimääräinen  $pK_a \approx 10$ ). Ne sitoutuvat solun negatiivisesti varautuneisiin komponentteihin, esimerkiksi DNA:han, RNA:han, proteiineihin sekä solukalvon fosfolipideihin. (Casero & Marton 2007.)

Aitotumallisissa soluissa polyamiinit säätelevät spesifisten geenien ilmentymistä. Ne ovat välttämättömiä solun jakautumiselle, kasvulle ja erilaistumiselle. Lisäksi polyamiineja tarvitaan solun normaaliin toimintaan, kuten DNA:n synteesiin ja stabiliteettiin, transkription säätelyyn, ionikanavien säätelyyn, proteiinien fosforylaatioon, ekstrasellulaaritalan korjaamiseen ja solujen välisiin liitoksiin. Runsaista vaikutustavoistaan johtuen ne ovat elintärkeitä myös sikiönkehitykselle. (Gerner & Meyskens 2004, Moinard ym. 2005, Soda 2011.)

Aito- ja esitumallisten solujen yleisimmät polyamiinit ovat voimakkaan hajuinen putreskiini (kaksi aminoryhmää), jota on etenkin mätänevässä lihassa (putrefaction [engl] = mätänemisprosessi). Spermidinillä (kolme aminoryhmää) taas vaikuttaa olevan keskeinen rooli solujen ikääntymisen ja oksidatiivisen stressin ehkäisyssä (Eisenberg ym. 2009). Pisin nisäkkäiden polyamiineista, spermiini (neljä aminoryhmää) löydettiin spermasta jo vuonna 1678. Spermiini sitoutuu solun DNA- ja RNA- kierteisiin vetysidoksin stabiloiden niitä. Spermiinin voimakas haju on tunnusomainen spermalle (Wang J-Y & Casero RA 2006.). Nisäkkäillä nämä polyamiinit johdetaan ureakierron välituotteesta, ornitiinista. Polyamiiniaineenvaihduntaan tarvittavat entsyymit löytyvät kaikista kudoksista. Polyamiineja saadaan myös ravinnosta, etenkin punaisesta lihasta sekä juustoista. Myös elimistön oma mikrobifloora suolistossa tuottaa polyamiineja. (Gerner & Meyskens Jr 2004.)

Eturauhanen on ainoa ihmisen kudoksista, jonka tuottamista polyamiineista suurin osa on tarkoitettu ensisijassa eritettäväksi solusta ulos (spermaan), eikä käytetä eturauhasen omassa aineenvaihdunnassa. Eturauhanen syntetisoi suuret määrät polyamiineja, kaikkein eniten spermiinia. Harrisonin jo vuonna 1931 tekemässä tutkimuksessa todettiin eturauhasen sisältävän kymmenkertaisen määrän toiseksi eniten polyamiineja sisältävään haimaan nähden. (Harrison 1931, Mi ym. 1998.)

## 1.2. Polyamiinien rooli normaalissa solun aineenvaihdunnassa



**Kuva 1: Polyamiinimetabolia, alkuperäinen kuva: Roine, 2014.** Lyhenteet: PT=polyamiinitransportteri, ODC= ornitiinidekarboksylaasi, SSAT= spermiini/spermiini N<sup>1</sup>-asetyylitransferaasi, SMO= spermiinioksidiaasi, APAO= N<sup>1</sup>-asetyylipolyamiinioksidiaasi; DAX= diamiinieksportteri.

Polyamiinien kierto on monimutkainen ja tarkoin säädelty prosessi. Ureakierron välivaiheen, ornitiinin, dekarboksylaatio ODC:n avulla putreskiiniksi on polyamiiniaineenvaihdunnan ensimmäinen vaihe. Putreskiiniin liitetään spermiidinsyntaasin avulla propyyliaminoryhmä, jolloin tuloksena on spermiidiini. Spermiidiiniin lisätään edelleen propyyliaminoryhmä spermiidinsyntaasin avulla, minkä seurauksena muodostuu spermiini.

Propyyliaminoryhmät saadaan S-adenosyyylimetioniinista (SAM). Reaktioon tarvitaan ensin SAMin dekarboksylaatio AMD:n (S-adenosyyylimetioniinidekarboksylaasin) avulla. Tämä tuottaa dekarboksyloituneen S-adenosyyylimetioniinin, joka luovuttaa propyyliaminoryhmänsä.

Spermidiinin ja spermiinin metaboliitit ovat asetyloituja tai diasetyloituja. SSAT (spermidiini/spermiini  $N^1$ -asetyylitransferaasi) monoasetyloi spermidiinin ja joko mono- tai diasetyloi spermiinin, jolloin tuloksena saadaan  $N^1$ -asetyylispermidiini,  $N^1$ -asetyylispermiini tai  $N1,N^{12}$ -diasetyylispermiini. Reaktioon tarvittava asetyyliryhmä otetaan asetyyli-CoA:sta.

Asetyloiduilla polyamiineilla on kaksi vaihtoehtoista hajoamisreittiä. Solu voi pumpata ne ulos diamiinieksportherin kautta, jolloin ne lopulta erittyvät virtsaan. Asetyloitujen polyamiinien huomattava piirre on niiden pysyvyys ja säilyminen virtsassa. Näin ollen ne ovat hyviä merkkiaineita. Toisaalta asetyloidut muodot toimivat myös substraatteina  $N^1$ -asetyylipolyamiinioksidaasille (APAO). Reaktiossa lopputuloksena on joko putreskiini tai spermidiini, riippuen lähtöaineesta. Näissä hapetusreaktioissa vapautuu vetyperoksidia, joka puolestaan aiheuttaa solulle oksidatiivista stressiä. (Soda 2011, Gerner & Meyskens 2004.)

Kirjallisuuslähteistä riippuen putreskiinin ja spermidiinin hapetusreaktion entsyymi on nimeltään DAO (diamiinioksidaasi), PAO (polyamiinioksidaasi) tai APAO ( $N^1$ -asetyylipolyamiinioksidaasi). Nämä entsyymit lienevät isoentsyymejä. Tässä työssä niitä käsitellään kuin yhtä entsyymiä.

Polyamiinien tuotanto ja hajottaminen ovat tarkasti kontrolloituja prosesseja. Liian vähäinen polyamiinipitoisuus estää solun kasvua ja normaalia toimintaa, kun taas liian suuri pitoisuus ohjaa solua apoptoosiin ja solun transformaatioon. Solun polyamiinipitoisuus riippuu voimakkaasti solusyklin vaiheesta. Säättely tapahtuu pääasiassa ODC:n ja AMD:n pitoisuutta muuttamalla. Myös arginaasi on merkittävässä asemassa.

ODC:n ilmentyminen solussa on voimakkainta solusyklin myöhäisessä  $G_1$ -vaiheessa (kasvuvaihe) ja aikaisessa S-vaiheessa (DNA:n replikaatio). ODC:lla on erittäin lyhyt puoliintumisaika (noin 10 minuuttia), joten nopeat pitoisuusvaihtelut ovat mahdollisia. ODC tuhoutuu proteasomi 26S:n välityksellä, jonne se kulkeutuu ODC-antitsyymiin kiinnittyneenä. Solun korkea polyamiinipitoisuus lisää antitsyymin mRNA:n translaatiota.

ODC:n kilpailevaa inhibiittoria, DFMO:a ( $\alpha$ -difluorometyyliornitiinia), käytetään lääkkeenä muun muassa *Pneumocystis carinii* – infektioissa, Länsi-Afrikan unitaudin myöhäisvaiheessa, Chagan taudissa, leishmaniasiksessa sekä malariassa. (Bettuzzi ym. 1999, Casero & Marton 2007.)

S-adenosyyliimetioniinidekarboksylaasin (AMD:n) määrä kasvaa solunjakautumisen käynnistävien yhdisteiden, mitogeenien läsnä ollessa. Samalla lisääntyy myös tämän entsyymin stabiliteetti. Polyamiinien pitoisuus vaikuttaa AMD:n aktiivisuuteen. Se lisää putreskiinia ja vähentää spermiidiiniä sekä spermiiniä. (Hölttä 1990.)

Polyamiinien asetylaatio SSAT:n avulla on rajoittava reaktio polyamiinien hajoamisessa ja muuntautumisessa. SSAT:n pitoisuus lisääntyy solunsisäisen polyamiinipitoisuuden kasvaessa, mikä auttaa estämään liiallisen polyamiinipitoisuuden haitalliset vaikutukset. (Moinard ym. 2005.)

### **1.3 Polyamiiniaineenvaihdunta syövässä**

Syövässä kasvainkudos kasvaa tervettä kudosta nopeammin. Koska polyamiinit ovat välttämättömiä solujen jakautumiselle ja kasvulle, niillä on tärkeä rooli syövän synnyssä, kasvamisessa sekä hoidoissa. Polyamiinimetabolia onkin häiriintynyt syövässä. Monet syöpälääkkeet tähtäävät polyamiinien biosynteesin hidastamiseen.

Rintasyöpäkudoksessa on havaittu 4–6 –kertaisia pitoisuuksia, paksusuolen syövässä 3–4 – kertaisia polyamiinipitoisuuksia terveeseen kudokseen verrattuna. Myös munuaissyövässä, virtsanjohdinsyövissä ja rakkosyövissä muodostuu huomattavasti enemmän polyamiineja terveeseen verrokkikudokseen nähden. (Saunders & Wallace 2010.) Eniten syntyy spermiiniä, sitten spermiidiiniä ja diamiineja. Spermiini/spermiidiini – suhde ei kuitenkaan poikkea normaalien solujen vastaavasta. (Koide ym. 1990).

Eturauhaskudoksessa polyamiinien metaboliaa säätelee pääasiassa kaksi entsyymiä: arginaasi ja diamiinioksidaasi (DAO). Arginaasi katalysoi ornitiinin synteesiä argitiinista, DAO katalysoi spermiinin ja spermiidiinin oksidaatiota putreskiiniksi. Molempien entsyymien määrät ovat lisääntyneet viisinkertaisiksi eturauhassyövässä verrattuna hyvänlaatuiseseen eturauhasen liikakasvuun. Hyvänlaatuisessa eturauhasen liikakasvussa kudos tuottaa runsaasti spermiiniä ja hieman vähemmän spermiidiiniä. Tämä muutos kuvastaa eturauhassolukon muuntautuneen proliferaatiovaiheesta erilaistuneempaan muotoon. Eturauhassyövässä spermiinimäärät ovat

puolestaan selkeästi alhaisempia. Syövässä solut ovat enemmän proliferaatiovaiheessa ja normaalitoiminta häiriintynyt. (Koide ym 1990, van der Graaf ym. 2000, Keskinen ym. 2001, Kawakita ym. 2006, Saunders & Wallace 2010.)

Syöpäsoluille tyypillistä on ornitiinidekarboksylaasin sekä AMD:n suuri aktiivisuus ja polyamiinien runsaus. Onkogeeneillä (ras, src, neu) transformoiduissa soluissa ODC:n aktiivisuus on pysyvästi kohonnut ja normaali solusyklin mukana kulkeva vaihtelu kadonnut. Onkogeenien ilmentymisen jälkeen ODC:n mRNA:n määrä ja entsyymien aktiivisuus lisääntyvät voimakkaasti ennen solujen morfologista transformaatiota. (Hölttä 1990.)

Eturauhassyöpäsoluilla tehdyssä tutkimuksessa synteettinen putreskiinianalogi kykeni estämään syöpäsolujen kasvun aiheuttamalla niissä apoptoosia spesifisten proteaasien, kaspasien, välityksellä. (Russo ym. 2007.). Polyamiinisynteesin aktivaattorit puolestaan estävät eturauhassyöpäsolujen proliferaatiota polyamiinivälitteisesti. (Kee ym. 2004.)

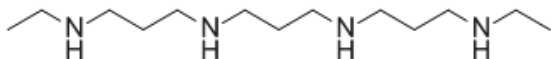
Potilaan veren ja virtsan polyamiinipitoisuudet kasvavat useissa syövässä. Mikäli syöpäleikkaus onnistuu, ja kasvain saadaan poistettua kokonaan, eritteiden polyamiinimäärät normalisoituvat. Vastaavasti syövän uusiessa polyamiinipitoisuudet kasvavat. (Kawakita & Hiramatsu 2006.)

Kuten aikaisemmin todettiin, virtsaan eritetyt polyamiinien metaboliitit ovat asetyloituvia tai diasetyloituvia. Näiden pitoisuus vaikuttaa lupaavalta merkkiaineelta useissa syövässä ja niillä näyttää olevan ennusteellista merkitystä taudin kannalta. (Hiramatsu ym. 1997, Nakayama ym. 2012.)

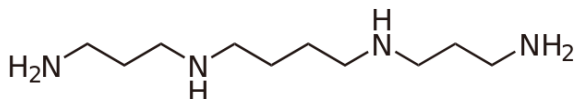
#### **1.4. DENSpm, sen rooli onkologiassa**

Polyamiinianalogit ovat luontaisten polyamiinien kaltaisia molekyylejä, jotka pääsevät solujen sisään ja täydentävät solunsisäistä polyamiinipoolia. Solun sisään kertyvät analogit eivät saa aikaan solun kasvua tai erilaistumista, vaan ne rajoittavat polyamiinien tuotantoa edistäviä ODC:a ja dcSAM:ia, indusoivat katabolisia entsyymejä SSAT:ia, APAO:a ja SMO:a, ja näin ollen vähentävät solunsisäistä polyamiinipitoisuutta. (Wolff ym. 2003, Tian ym. 2012.)





Kuva 2: DENSpM (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)



Kuva 3: Spermiini (<http://www.wikiwand.com/fi/Spermiini>)

N<sup>1</sup>,N<sup>11</sup>–dietylinorspermiini, eli lyhyemmin DENSpM, on spermiinianalogi. Se on hyvin potentti SSAT-entsyymin indusoiija, nostaen entsyymin aktiivisuutta 200-1000 -kertaiseksi, mikä aiheuttaa soluissa apoptoosin. Se vaurioittaa syöpäsolujen mitokondrioita vapauttamalla sytokromi C:tä sytoplasmaan ja aktivoiden kaspasivälitteiset transduktiot. DENSpM:n aiheuttaman SSAT-entsyymin yli-ilmenemisen on todettu olevan syynä glioblastoomasolujen irtaantumiseen ja apoptoosiin. Ornitiinidekarboksylaasin aktiivisuus vähenee DENSpM:n vaikutuksesta ja tämäkin vähentää solunsisäistä polyamiinimäärää. DENSpM:lla on todettu olevan syöpää estäviä vaikutuksia monilla eri solutyypeillä. (Tian ym. 2012.)

DENSpM:a on käytetty tutkimusasetelmissä erilaisten syöpien hoidossa. Rintasyöpäpotilailla todettiin otoskooltaan melko pienessä kokeessa analogin olevan varsin siedetty ja turvallinen potilaalle pieninä annoksina (Wolff ym. 2003). DENSpM yhdistettynä jo pidempään käytössä olevien syöpälääkkeiden kanssa (esimerkiksi fluorourasiili ja oksaliplatiini) aiheuttaa lisääntynyttä solukuolemaa. Yhdistelmä lisää SSAT:n aktiivisuutta sekä tehostaa lääkkeiden vaikutuksia. (Saunders & Wallace 2010). DENSpM:n yhdistäminen sädehoitoon kolorektaalisyövän hoidossa vaikuttaa lupaavalta yhdistelmältä solutason tutkimuksessa. (Qutob ym. 2000.)

## 2. Elektroniset nenät

### 2.1. Toimintaperiaate

Ihmisen nenän yläosassa on molemmiin puolin hajuepiteeliä n. 2-3 cm<sup>2</sup> alueella. Hajuepiteelin päällä on limaa, johon haihtuvat hajua tuottavat molekyylit tarttuvat ja liukenevat. Hajujen reseptoriproteiineja on ihmisellä vain tuhat, mutta tästä huolimatta kykenemme erottamaan kymmeniä tuhansia eri hajuja. Ihmisen nenä ei haista suinkaan kaikkia haihtuvia eli volatiivisia aineita. Vesihöyry ja häkä ovat esimerkkejä aineista, jotka eivät aiheuta aistimusta.

Reseptorit ovat järjestäytyneet tarkasti. Aivojen hermoverkot yhdistävät järjestäytyneistä reseptoreista tulevaa tietoa. Hajuaistimus riippuu siitä, mistäpäin epiteeliä impulssi tulee ja miten moneen reseptoriin odoranttimolekyylillä on affiniteettia.

Koirien hajuaisti on tunnetusti ihmisen vastaavaa huomattavasti parempi. Hajuepiteelin pinta-ala koiralla on noin kolmekymmentä kertaa suurempi kuin ihmisellä ja reseptoriproteiineja siinä on noin 1000. Lisäksi värekarvoja soluissa on kaksinkertaisesti ihmisiin verrattuna. (Greenberg & Haraway 1998.) Erinomaisen hajuaistinsa takia vainukoiria on käytetty yli sadan vuoden ajan työvälineinä niin sotilas- kuin pelastustoiminnassa. Esimerkkeinä työtehtävistä ovat ihmisten löytäminen raunioista, eksyneiden jäljittäminen, rikollisten tunnistaminen, huumeiden ja räjähteiden etsiminen. (Lesniak ym. 2008.)

Keinonenän periaate on tunnistaa haju samoin kuin biologisen nenän. Ensimmäinen keinonen eli kemiallinen hajuanalysaattori oli Persaudin ja Doddin vuonna 1982 kehittänyt puolijohdesensoripohjainen laite, jolla kyettiin erottamaan erilaisia hajuja. Tyypillisesti elektronisessa nenässä on useita erilaisia mittauskennoja. Sensoriformaatteina voivat olla polymeerit, joilla on erilaiset palautuvat fysiokemialliset ominaisuudet ja herkkyydet volatiivisille aineille. Toisia formaatteja ovat metalli-oksidi -sensorit, joiden johtuminen muuttuu volatiivien mukaan. Osassa keinoneniä on lisäksi pii-kenttä. Myös pietsosähköisiä kiteitä tai optisia sensoreita on käytössä näissä laitteissa. (Turner & Magan 2004.)

Kiinnostuksen kohteena oleva haju on harvoin ilman taustahajua. Elektroniset hajuanalysaattorit analysoivat kaikki hajut, jolloin haasteena on erottaa merkitykselliset hajut merkityksettömistä. Näin ollen mittauskennoista saatu data analysoidaan sumeaa logiikkaa käyttäen matkien hermoverkon toimintaa. Lääketieteellisissä tutkimuksissa pyritään esimerkiksi tunnistamaan syövän hajun kemiallinen hahmo. (Kermany ym. 1998, Kermany ym. 1999.)

Laitemalleja on useita, mutta kaikissa on samat kolme toimintoa. Haihtuva kaasu liikkuu tunnistusmatriisiin ylitse, sensorien johtamiskyky muuttuu ja lähettää signaalin. Tällä tavoin saatu tieto kootaan ja lopulta tuotetaan tulos.

Elektronisia neniä on käytetty niin huumeiden, räjähteiden ja taistelukaasujen sekä ruuan pilaantumisen ja tautien havaitsemiseen. Näissä tilanteissa tarvitaan herkkää laitetta, joka tunnistaa hajun pieninä pitoisuuksina.

## 2.2. Sovellukset syöpädiagnostiikassa

Koska syöpäkasvaimet tuottavat runsaasti voimakkaan hajuisia polyamiineja, on hajuaistin käyttäminen tautidiagnostiikassa luontevaa. Haihtuvien orgaanisten yhdisteiden analysointi on kuitenkin monimutkaista, eikä siihen ole ollut yksinkertaisia laitteita.

Käsitys siitä, että syövällä on tunnistettava haju, esitettiin ensi kerran Lancetissa julkaistussa kirjeessä vuonna 1989. Siinä kuvattiin tapaus, jossa omistajansa kanssa sairaalaan tullut koira osoitti määrätietoista kiinnostusta potilaan jalassa olevaan ihomuutokseen. Kyseinen ihomuutos osoittautui myöhemmin melanoomaksi. (Williams & Pembroke 1989.)

Ensimmäisenä syövän tunnistamiseen opetettuja koiria käytettiin keuhkosityövän hajudiagnostiikassa. Koirat kykenevätkin tunnistamaan monia eri syöpätyyppejä. Koirien laajamittainen käyttö diagnostisina välineinä ei kuitenkaan sovellu sairaalaloihin muun muassa hygieniasyistä. Lisäksi koirien kyky tunnistaa syöpäpotilaat heikkenee ajan myötä hajuaistin tottuessa.

Massaspektrometri on erittäin tarkka ennalta määritettyjen yksittäisten molekyylien tunnistamisessa ja mittaamisessa. Sen sijaan sitä ei ole suunniteltu tunnistamaan vaihtelevia VOC-yhdistelmiä. Massaspektrometrin käyttö on kallista. Näytteiden analysointi on työlästä ja aikaa vievää. Näin ollen massaspektrometriä ei käytetä kovinkaan laajasti. (Wilson & Manuela 2011.)

Keinonenillä saadut tutkimustulokset ovat lupaavia. Pienehkö kannettava elektroninen nenä havaitsee eron keuhkosityöpöpotilaan ja terveen verrokin uloshengitysilmassa. Machadon johtamassa tutkimuksessa vuonna 2005 elektroninen nenä erotti 71.4 prosentin herkkyydellä ja 91.9 prosentin tarkkuudella 14 keuhkosityöpöpotilasta verrokeista. (Machado ym. 2005.)

Monet keinonenää hyödyntävistä tutkimuksista keskittyvät keuhkosityöpään ja sen aiheuttamiin muutoksiin uloshengitysilmassa. Itse syöpäkasvaimen hajua ei ole analysoitu, hengitysilman volatiivisiin aineisiin vaikuttavat monet muutkin muuttujat.

Aikaisemmin on jo osoitettu, että elektroninen nenä kykenee erottamaan kasvatetuista solulinjoista malignit benigneistä (Roine ym. 2012) ja lisäksi, että eturauhassyöpä voidaan erottaa hyvänlaatuisesta liikakasvusta virstanäytteen kaasufaasia haistellen (Roine ym. 2014). Verrattuna

massaspektrometriin elektroninen nenä tunnistaa laajemman joukon haihtuvia orgaanisia yhdisteitä. Elektronisen nenän etuina ovat myös laitteen helppokäyttöisyys ja kyky analysoida valmistelemattomia näytteitä normaalissa ilmanpaineessa. Sen käyttö on huomattavasti halvempaa ja laitekoko sallii helpon liikuttelun. (Wilson & Manuela 2011.) Viime vuosina elektronista nenää on käytetty etenkin keuhkosityövän ja melanooman tunnistamiseen. (Di Natale ym. 2003, Machado ym. 2005, D'Amigo ym. 2008, Dragonieri ym. 2009, D'Amigo 2010.)

### 3. Tutkimushypoteesit

Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää, eroavatko eturauhassyöpäsolujen ja hyvänlaatuisten eturauhassolujen hajut toisistaan ja miten polyamiinieritystä lisäävä DENSpm vaikuttaa solujen ja niiden mediumien hajuun. Voimakkaat muutokset mediumin hajussa viittaisivat polyamiinien keskeiseen rooliin ”syövän hajun” taustalla olevina molekyyleinä. Syöpäsoluina käytettiin LNCaP-soluja ja verrokkeina EP-156T-soluja.

Tässä tutkielmassa keskitytään selvittämään seuraavia hypoteeseja:

1a. LNCaP ja EP-156T –solujen hajut eroavat toisistaan 0 h kohdalla.

1b. LNCaP ja EP-156T -solujen hajut eroavat toisistaan 96 h kohdalla.

2a. LNCaP –solujen haju muuttuu välillä 0 h - 96 h

2b. EP-156T –solujen haju muuttuu 0 h - 96 h

3a. LNCaP -solujen mediumin haju muuttuu välillä 0 h – 96 h

3b. EP-156T -solujen mediumin haju muuttuu välillä 0 h – 96 h

4a. LNCaP –solujen ja niiden mediumin hajut eroavat toisistaan 0 h kohdalla.

4b. EP-156T -solujen ja niiden mediumin hajut eroavat toisistaan 0 h kohdalla.

5a LNCaP -solujen ja niiden mediumin hajut eroavat toisistaan 96 h kohdalla.

5b EP-156T -solujen ja niiden mediumin hajut eroavat toisistaan 96 h kohdalla.

## 4. Aineisto ja menetelmät

### 4.1. Soluviljelmät

LNCaP-solut ovat peräisin levinnyttä eturauhaskarsinoomaa sairastaneelta valkoihoiselta mieheltä. Etäispesäke oli vasemmassa supraklavikulaarisessa imusolmukkeessa. Vastaavasti EP-156T -solut ovat lähtöisin 66-vuotiaan potilaan eturauhasesta ja ne ovat telomeraasi-immortalisoituja. EP-156T solut käyttäytyvät kuten eturauhasen tyvisolut (Kogan ym. 2006). Molempia solulinjoja on käytetty paljon vastaavissa tutkimusasetelmissä.

Solulinjat kasvatettiin tuottajan ohjeiden mukaan (LNCaP: American Type Culture Collection – LGC Standards, Teddington, YK, sekä EP-156T: V Rotter; Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel). Viljelyssä käytettiin 100 x 20 mm soluviljelymaljoja (NUNC, International, NY, USA).

Maljalle lisättiin 10 ml viljelynestettä, joka LNCaP-soluille oli RPMI-1640 medium (BioWhitaker/Lonza, Verviers, Belgia) lisättynä 10 % standardoitua naudan sikiön seerumia (HyClone Laboratories, Inc., UT, USA) ja 2 mM L-glutamiinia (BioWhiteker/Lonza). EP-156T-solujen kasvatusneste puolestaan oli seerumitonta keratinosyyttiä (Gibco, Life Technologies, Ltd, Paisley, YK), johon lisättiin 1 % standardoitua naudan sikiön seerumia (HyClone) sekä 5 ng/ml natriumseleniittiä (Sigma-Aldrich, MO, USA), 5 ng/ml epidermaalista kasvutekijää (Invitrogen Inc. Helsinki, Suomi), 50 µg/ml naudan aivolisäkeuutetta (Invitrogen) ja 10 nM dihydrotestosteronia (A2570-000, Steraloids, Inc. RI, USA).

Analysoitavat näytteet kerättiin, kun kasvu ylsi 80 % konfluenssiin. LNCaP-solut saavuttivat tämän kattavuuden noin neljässä vuorokaudessa, vastaavasti EP-156T-solut 6 vuorokaudessa.

Kasvatusaine (=medium) kerättiin ja jäädytettiin (-80 °C). Solut käsiteltiin trypsiinillä ja sentrifugoitiin (200 x g, huoneenlämmössä). Tämän jälkeen solut pestiin fosfaattipuskuroidulla suolaliuksella ja sentrifugoitiin uudelleen. Muodostuneet solupelletit pakastettiin -80 celsiusasteessa. Kontrollinäytteiksi edellä mainitulla tavalla käsiteltiin myös pelkkää mediumia.

Molemmista solulinjoista tehtiin näin 2 x 5 viljelmän sarjaa. Toista sarjaa käsiteltiin DENSp<sub>m</sub>-solunsalpaajalla. Näytteet kerättiin 0 h ja 96 h kohdalla. Tässä tutkimuksessa käsiteltiin ainoastaan DENSp<sub>m</sub>:llä käsiteltyjä näytteitä, jolloin aineistoksi muodostui 20 solu- ja 20 mediumnäytettä.

## 4.2 ChemPro 100

Tässä tutkimuksessa käytettiin suomalaisen Environics Oy:n valmistamaa ChemPro 100 - kaasuanalysaattoria. Kyseessä on Open Loop Ion Mobility Spectrometry eli IMS. Analysaattori liitettiin kannettavaan tietokoneeseen, jossa oli Windows UIP -ohjelmisto. Tämä laitteisto mahdollistaa kemiallisen spektrin tallentamisen reaaliajassa myöhempää analysointia varten.

IMS-tekniikalla volatiiviset molekyylit luokitellaan niiden varauksen, massan sekä liikkuvuuden mukaan. Molekyylien liikkumiskykyyn vaikuttavat sen koko ja muoto. IMS-tekniikka hyödyntää ionien ja ilmamolekyylien välisiä törmäyksiä ja mittaaminen voidaan suorittaa normaalissa ilmanpaineessa. ChemPro 100 -laitteessa käytetään Am-241-säteilylähdettä, joka ionisoi laitteeseen imetyt molekyylit. Ilmanäytteen ionisoinnin jälkeen ionit ohjataan virtausputkeen, joka on eristetty ympäröivästä ilmasta. Virtausputkessa on tasainen heikko sähkökenttä, joka poikkeuttaa ioneja kohti putken seinämällä olevia detektoreja. Törmäykset muihin molekyyleihin hidastavat ionien liikettä. Osa molekyyleistä osuu detektoreihin aiheuttaen sensoreihin sähköisiä signaaleja, joiden perusteella saadaan tietoa ionivarauksen identiteetistä ja konsentraatiosta.

Ioni-molekyylireaktiosarjan seurauksena näytemolekyyli, jossa on korkea protoniaffiniteetti, reagoi kosteassa ilmassa protonitransferin vaikutuksesta positiivisesti varautuneeseen ioniin. Selektiivisyyttä voidaan muokata lisäämällä virtauskaasuun ammoniakkia, asetonia tai klooriyhdisteitä tai muita vastaavia aineita. Aineet, joissa on elektroninsieppausominaisuuksia, kuten halogenoidut yhdisteet, voidaan tunnistaa potentiaalisen inversion ja negatiivisten ionien kautta. Toinen usein käytetty vaihtoehto on UV-fotoionisointi, missä tutkitaan riittävän alhaisen ionisaatiopotentiaalin yhdisteitä. Se soveltuu mittaamiseen tilanteissa, joissa molekyylien ionisaatiopotentiaali on alhaisempi kuin 8-12 eV.

## 4.3. Mittausjärjestely

Tutkimusnäytteet asetettiin lasisille petrimaljoille (halkaisija 10 cm), jotka oli peitetty parafiinikalvolla. Tasaantumisan jälkeen laite otti imuilmänäytteen (gaseous headspace) kanyylin kautta ja korvausilma kanavoitiin paksulla neulalla.

Kokeet suoritettiin laminaarivirtauskaapissa (Kojair) siten, että petrimaljat olivat vesihauteessa (37 °C) ja niiden annettiin tasaantua 10 minuutin ajan. Laitteella mitattiin keraamisissa kennoissa (16 kpl) ja kaasujen havaitsemiseen tarkoitetuissa erillisissä puolijohdekennoissa (2 kpl) sähkökentän ylläpitämiseen vaadittavan virran (pA), mikä muuttuu hiukkasten koon ja varauksen mukaan.

Puolijohdekanavat jätettiin analyysin ulkopuolelle. 16-kanavainen aineisto analysoitiin käyttäen Matlab-ohjelmistoa (Mathworks, Natick, MA). Tiedot analysoitiin Tampereen teknillisessä yliopistossa. Pienillä aineistoilla moniulotteinen data edellyttää dimensioreduktiota. Dimensioreduktiossa käytettiin pääkomponentti analyysia (principal component analysis, PCA) ja moniulotteista skaalausta (multidimensional scaling, MDS).

Kuvat ja luokittelut on tehty sekä MDS- että PCA-reduktiolla. Ristivalidaatio suoritettiin leave one out -menetelmällä. Menetelmän periaatteena on arvioida kuinka yleistettävä malli tulosten perusteella saadaan.

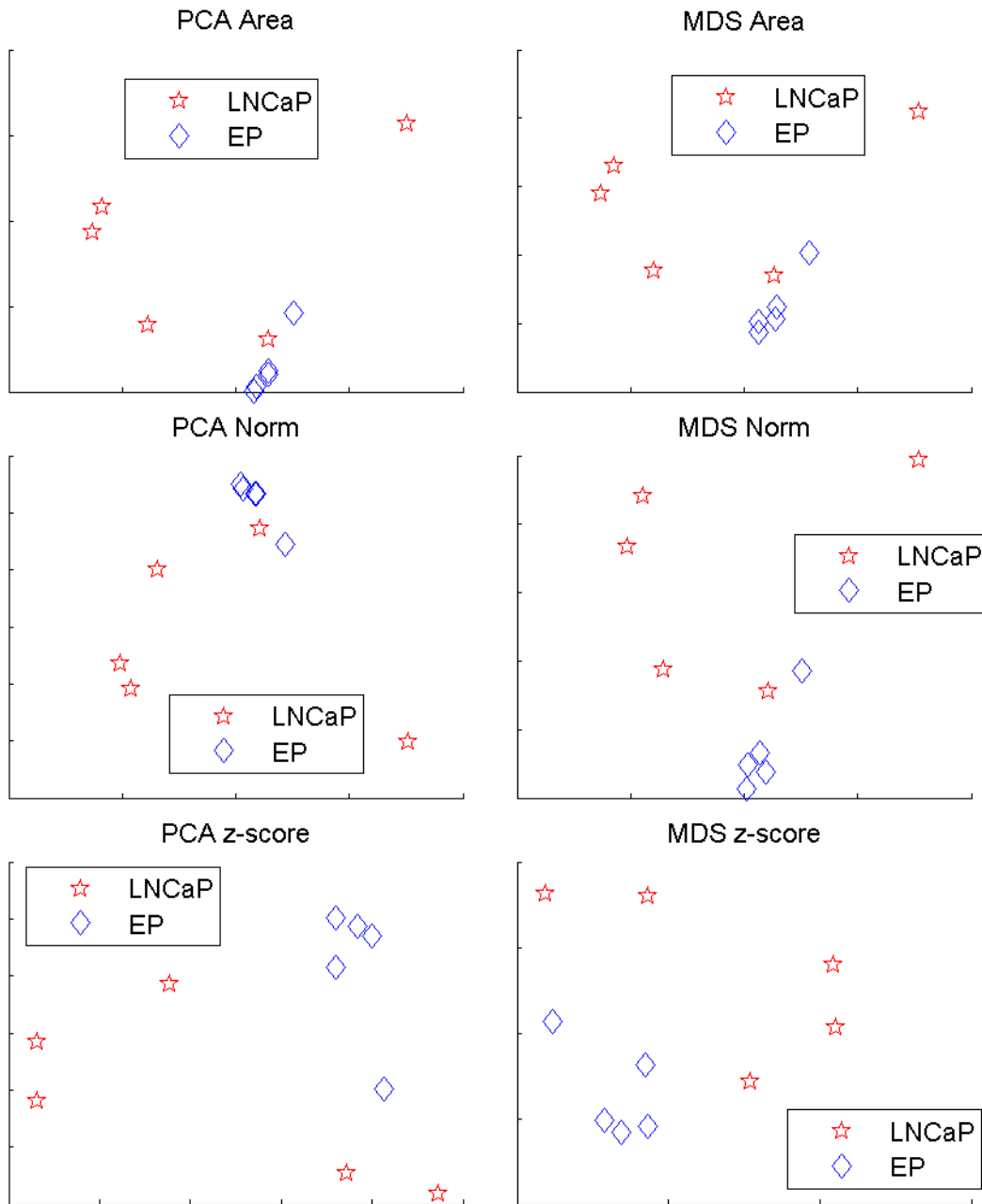
## **5. Tulokset**

Aineisto on tutkittu kesäkuussa 2012.

Tutkimusaineistossa on yhteensä 40 näytettä. Jokaista hypoteesia varten tutkittiin 10 näytettä, missä on 5 kumpaakin vertailtavaa tulosta. Muuttujia on 16, joten tulosten luokittelua varten tarvittiin dimensioreduktio.

Kuvat ja luokittelut on tehty sekä MDS- että PCA-reduktiolla. Kuvat on redusoitu kahteen ulottuvuuteen ja luokittelussa on tehty leave one out-ristiinvalidoinnit dimensioilla 2-5.

Hypoteesi 1a: LNCaP ja EP-156T –solujen hajut eroavat toisistaan 0 h kohdalla.

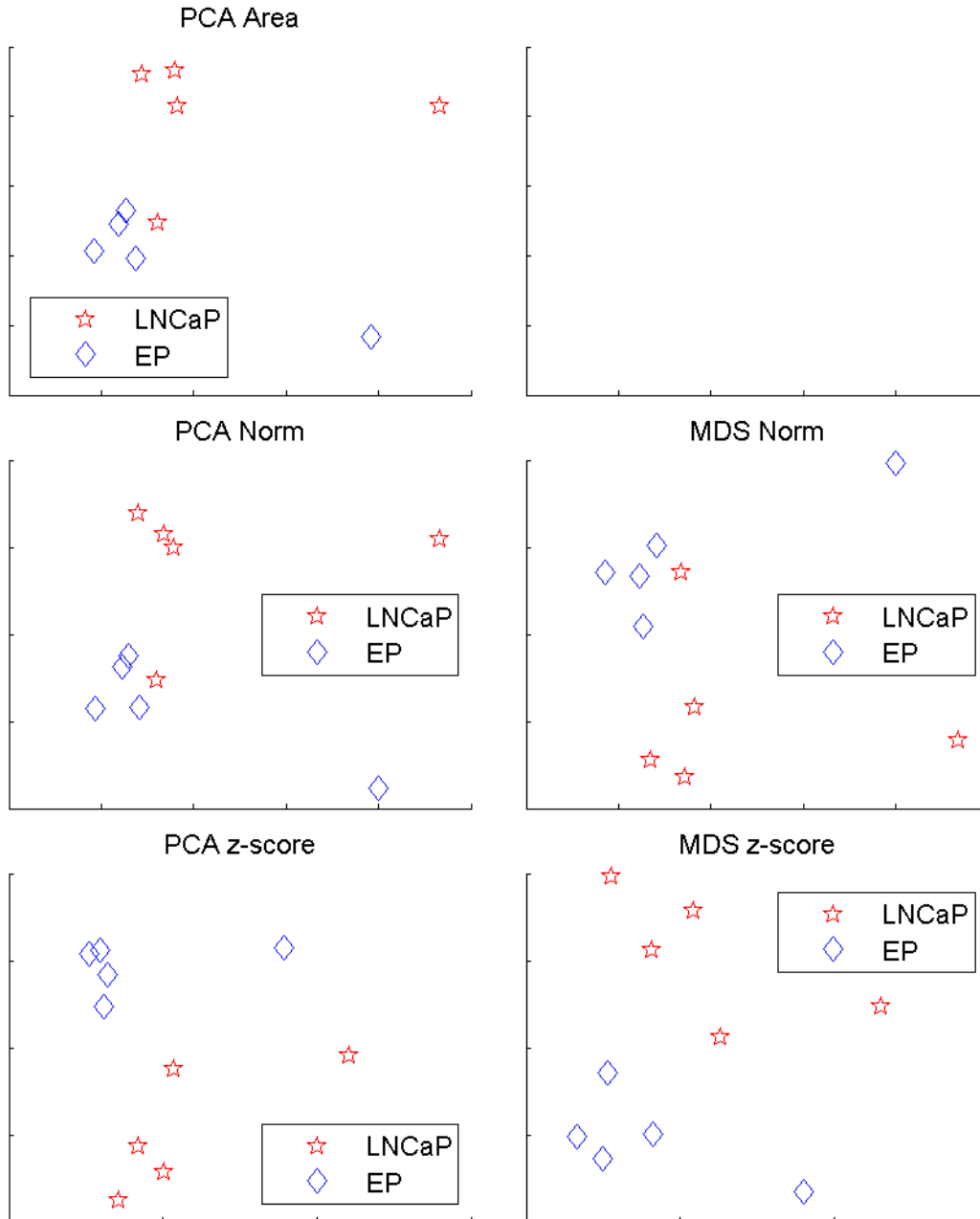


D	AREA		NORM		z-score	
	PCA	MDS	PCA	MDS	PCA	MDS
2	20	30	20	20	20	20
3	20	10	20	10	20	20
4	10	20	10	20	10	20
5	10	10	20	10	10	10
6	20	NA	0	0	10	10
KA	16	18	14	12	14	16

Virheluokitteluprosentti on keskimäärin 15 (vaihteluväli eri menetelmillä 10-14), joten luokittelu onnistuu hyvin. Tämä voidaan todeta myös silmämääräisesti.



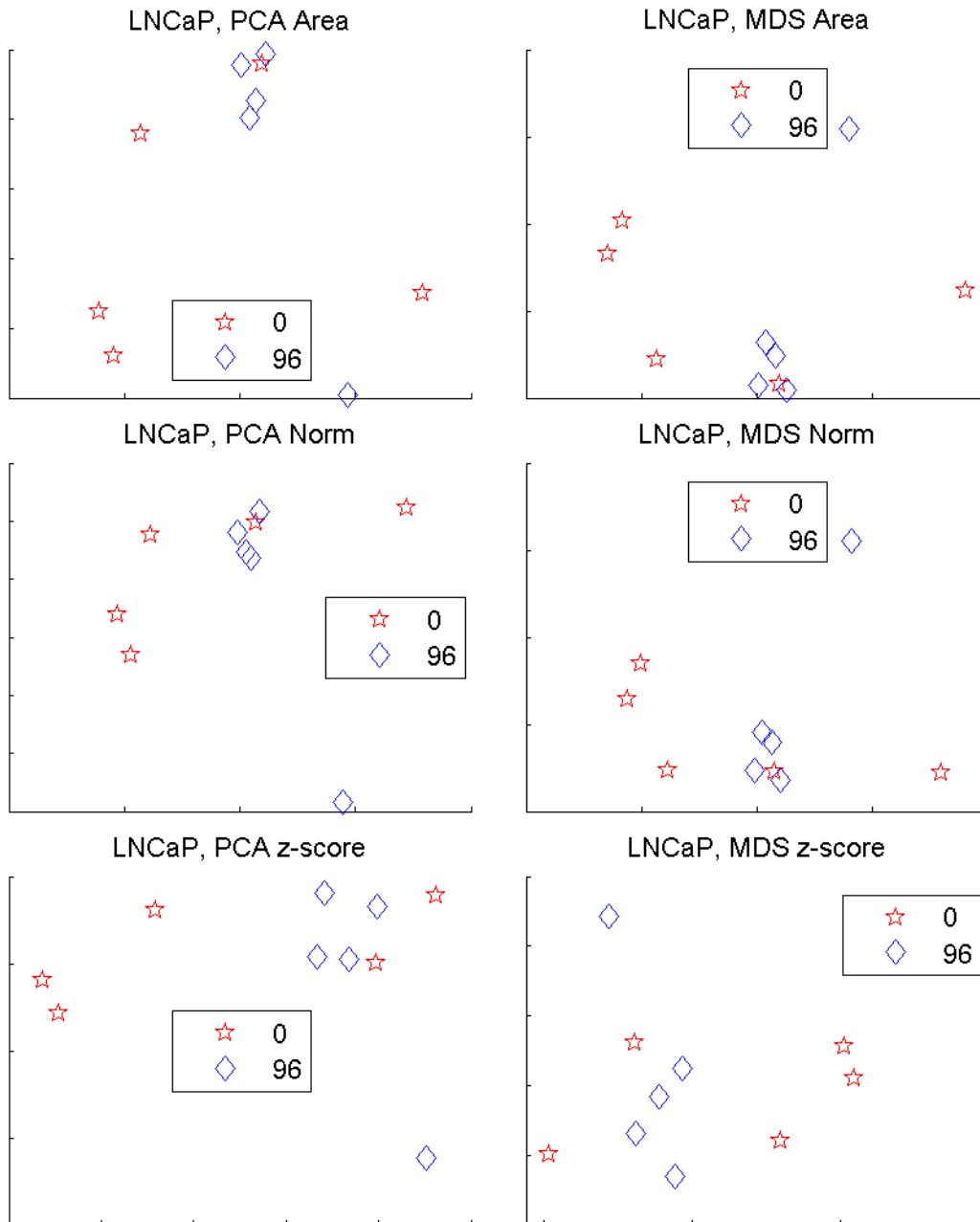
Hypoteesi 1b: LNCaP ja EP-156T -solujen hajut eroavat toisistaan 96 h kohdalla.



D	AREA		NORM		z-score	
	PCA	MDS	PCA	MDS	PCA	MDS
2	10	NA	10	10	0	0
3	10	NA	10	10	30	30
4	30	NA	30	30	0	0
5	0	NA	20	20	0	0
6	10	NA	20	20	0	0
KA	12	NA	18	18	6	6

Virheluokitteluprosentti on keskimäärin 12 (vaihteluväli 6-18 %) eli erottelu onnistuu hyvin ja toteutuu myös silmämääräisesti. AREA-MDS ei onnistunut.

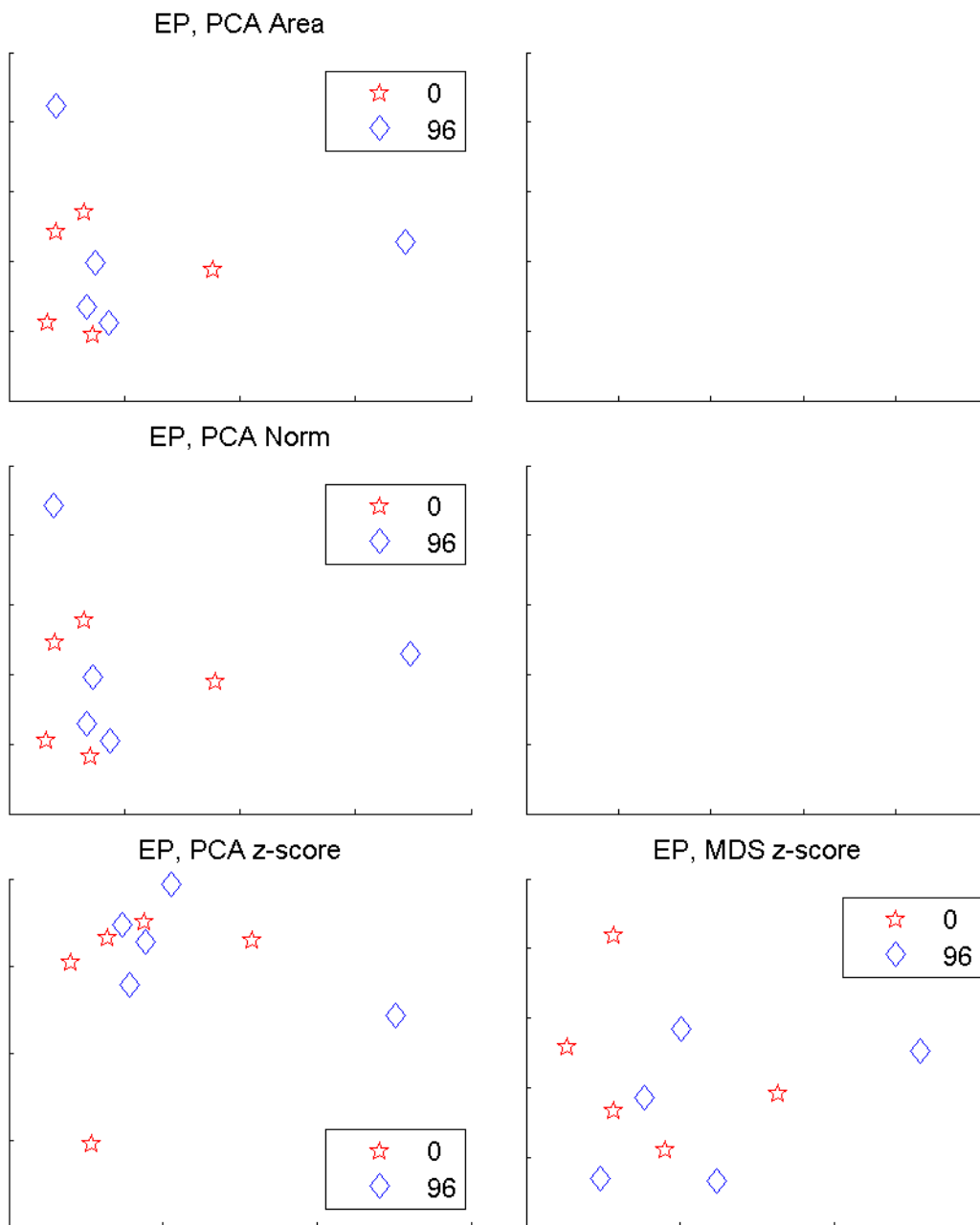
Hypoteesi 2a: LNCaP –solujen hajut eroavat toisistaan 0 h ja 96 h kohdalla.



D	AREA		NORM		z-score	
	PCA	MDS	PCA	MDS	PCA	MDS
2	30	30	70	80	30	40
3	20	20	20	20	40	40
4	20	20	20	20	30	30
5	30	30	20	20	30	30
6	40	50	40	40	50	50
KA	28	30	34	36	36	38

Virheluokitteluprosentti on keskimäärin 33 (vaihteluväli 28-38 %) eli luokittelu onnistuu kohtalaisesti. Hypoteesi 2a toteutuu, eli solujen haju muuttuu hieman.

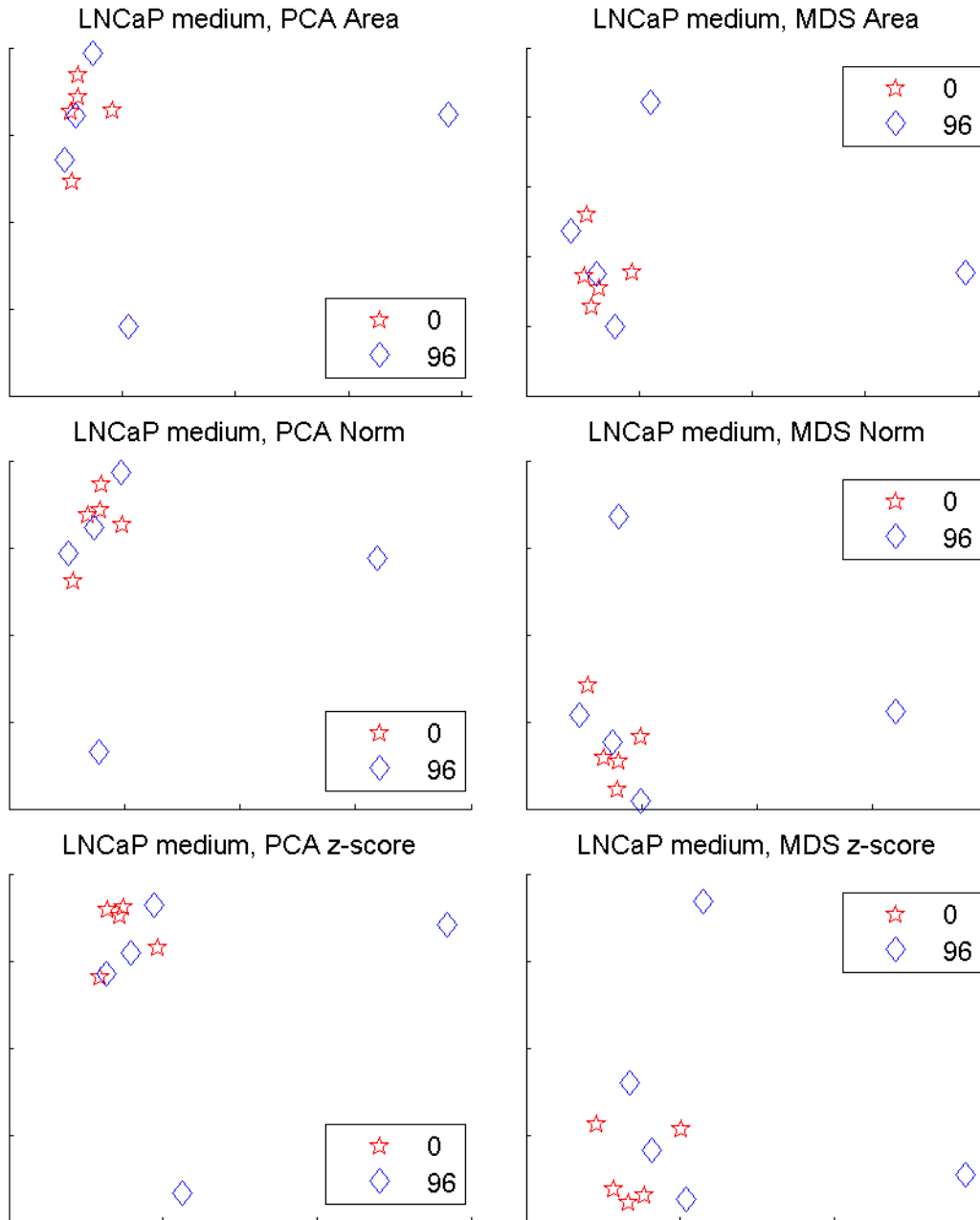
2b: EP-156T –solujen hajut eroavat toisistaan 0 h ja 96 h kohdalla.



D	AREA		NORM		z-score	
	PCA	MDS	PCA	MDS	PCA	MDS
2	80	NA	80	NA	60	60
3	90	NA	90	NA	70	70
4	70	NA	50	NA	90	70
5	70	NA	70	NA	30	40
6	60	NA	60	NA	30	30
KA	60	NA	60	NA	30	30

Virheluokitteluprosentti on keskimäärin 45 (vaihteluväli 30-60 %) eli luokittelu onnistuu heikosti. .  
Hypoteesi 2b ei toteudu. Solujen hajut eivät eroa toisistaan.

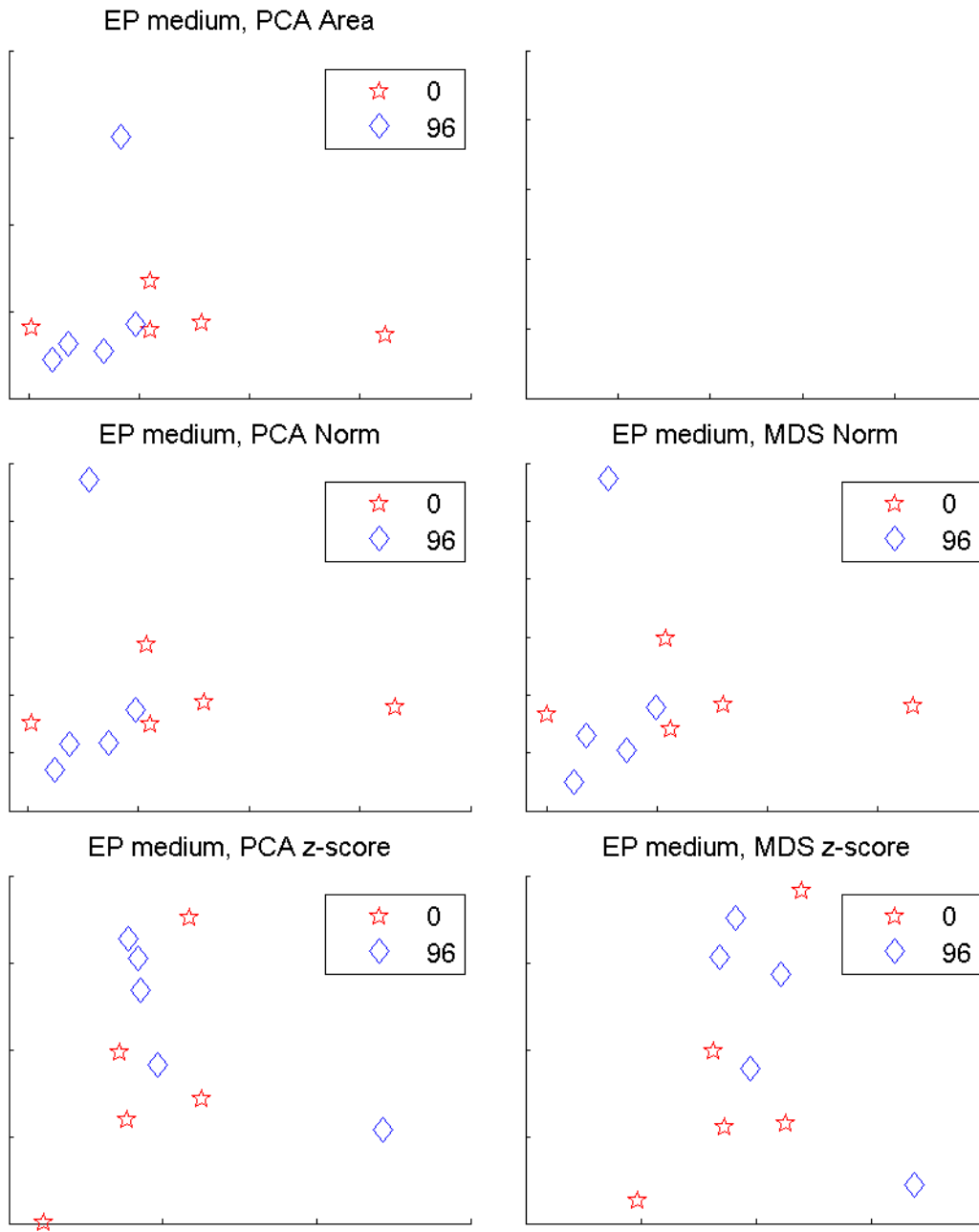
Hypoteesi 3a: LNCap -solujen mediumin haju muuttuu välillä 0 h – 96 h.



D	AREA		NORM		z-score	
	PCA	MDS	PCA	MDS	PCA	MDS
2	50	50	50	50	30	40
3	50	50	40	60	50	40
4	70	70	60	70	30	30
5	20	50	10	10	30	40
6	30	30	20	10	30	40
KA	44	50	36	40	34	38

Virheluokitteluprosentti on keskimäärin 40 (vaihteluväli 34-50 %) eli luokittelu onnistuu heikosti. Tämä hypoteesi ei toteudu. LNCap -solujen mediumin haju ei muutu 96 tunnissa.

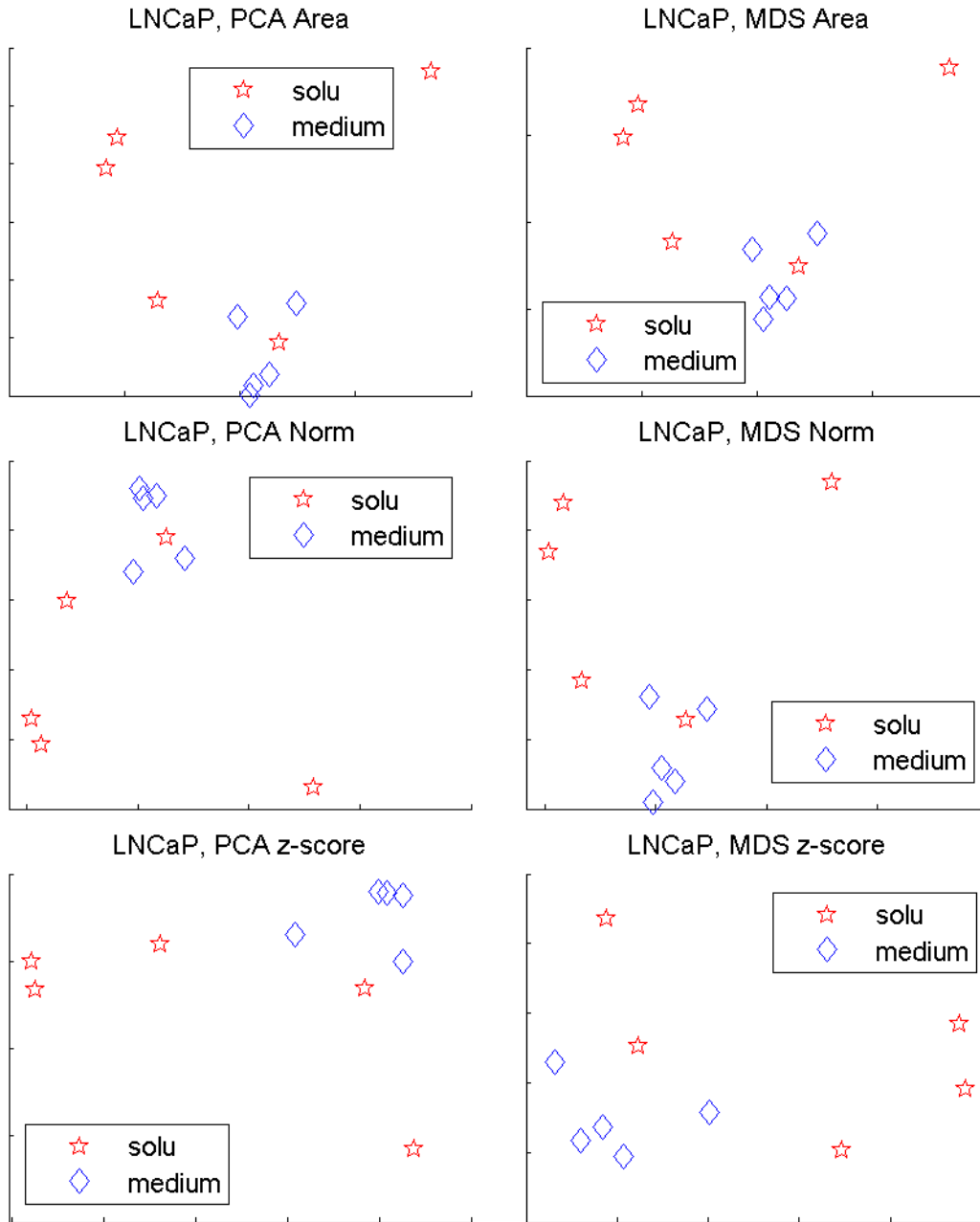
Hypoteesi 3b: EP-156T -solujen mediumin haju muuttuu välillä 0 h – 96 h.



D	AREA		NORM		z-score	
	PCA	MDS	PCA	MDS	PCA	MDS
2	40	NA	40	40	40	50
3	50	NA	40	80	60	60
4	50	NA	50	40	60	50
5	60	NA	40	60	60	50
6	70	NA	70	70	70	60
KA	54	NA	48	58	58	52

Virheluokitteluprosentti on keskimäärin 54 (vaihteluväli 48-58 %) eli luokittelu ei onnistu. Hypoteesi ei siis toteudu. EP-156T -solujen mediumin haju ei muutu 96 tunnissa.

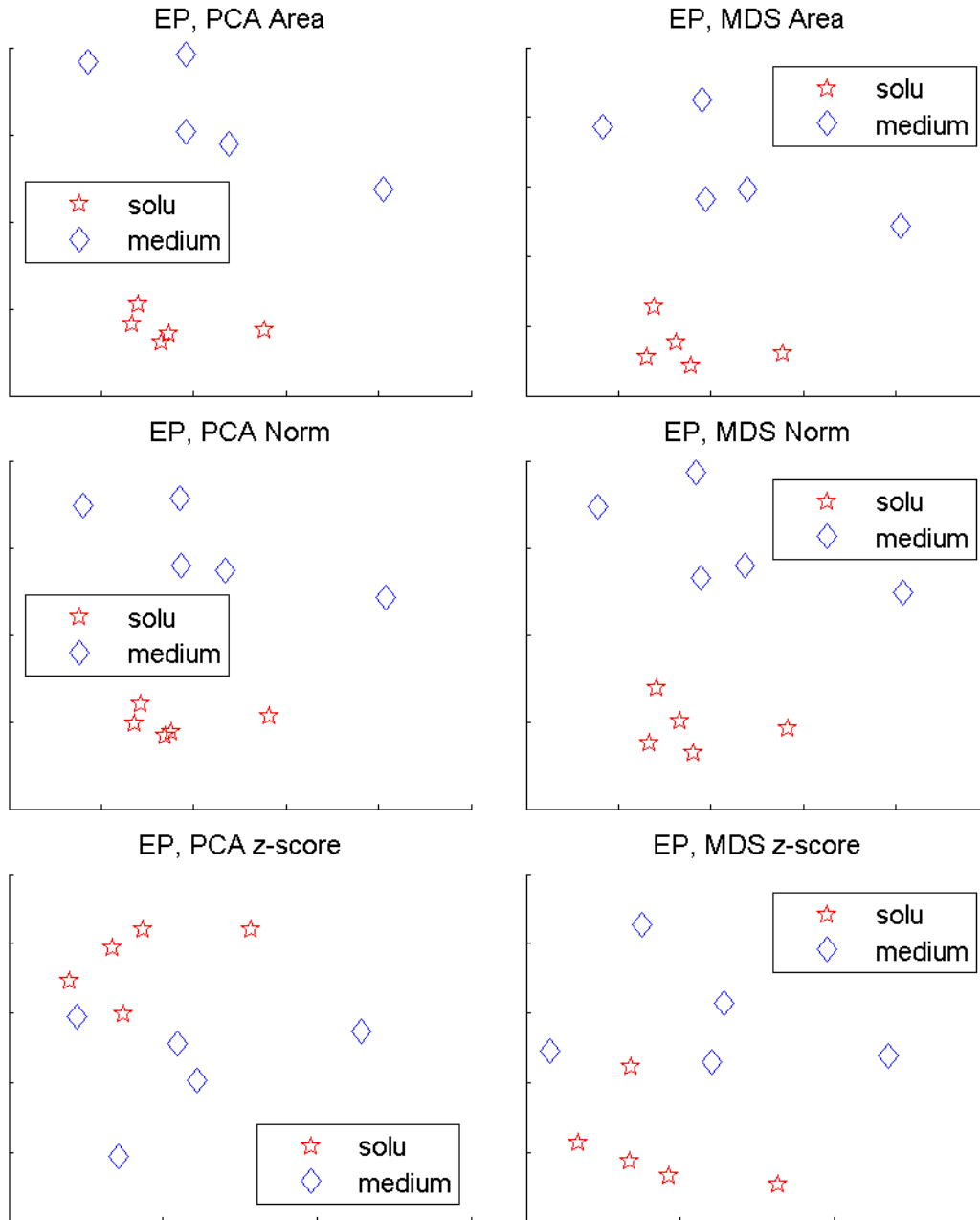
Hypoteesi 4a: LNCaP –solujen ja niiden mediumin hajut eroavat toisistaan 0 h kohdalla.



D	AREA		NORM		z-score	
	PCA	MDS	PCA	MDS	PCA	MDS
2	30	30	20	30	10	20
3	30	40	30	30	10	10
4	30	30	40	40	10	0
5	40	40	20	40	0	0
6	10	0	10	10	0	10
KA	28	28	24	30	6	8

Virheluokitteluprosentti on 21 (vaihteluväli 6-30 %) eli luokittelu onnistuu kohtalaisesti. LNCaP -solujen ja niiden mediumin hajut eroavat jonkin verran toisistaan 0 h kohdalla.

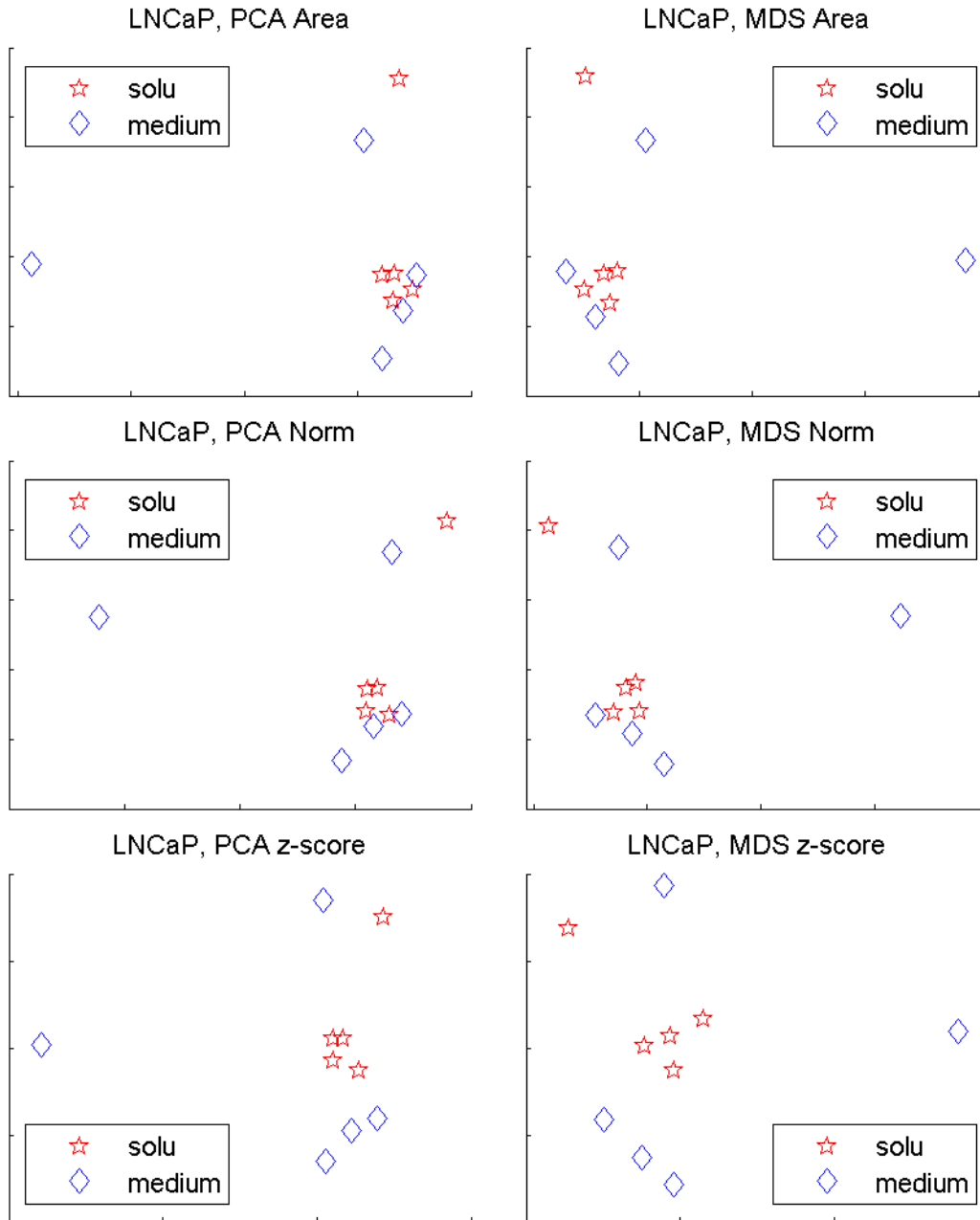
Hypoteesi 4b: EP-156T -solujen ja niiden mediumin hajut eroavat toisistaan 0 h kohdalla.



D	AREA		NORM		z-score	
	PCA	MDS	PCA	MDS	PCA	MDS
2	0	0	0	0	10	20
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	NA	0	0	0	0
6	0	NA	0	0	0	0
KA	0	NA	0	0	2	4

Virheluokitteluprosentti on keskimäärin 1 (vaihteluväli 0-4 %) eli luokittelu onnistuu erinomaisesti. Hypoteesi on tosi. EP-156T -solujen ja niiden mediumin hajut eroavat toisistaan 0 h kohdalla.

Hypoteesi 5a: LNCaP -solujen ja niiden mediumin hajut eroavat toisistaan 96 h kohdalla.

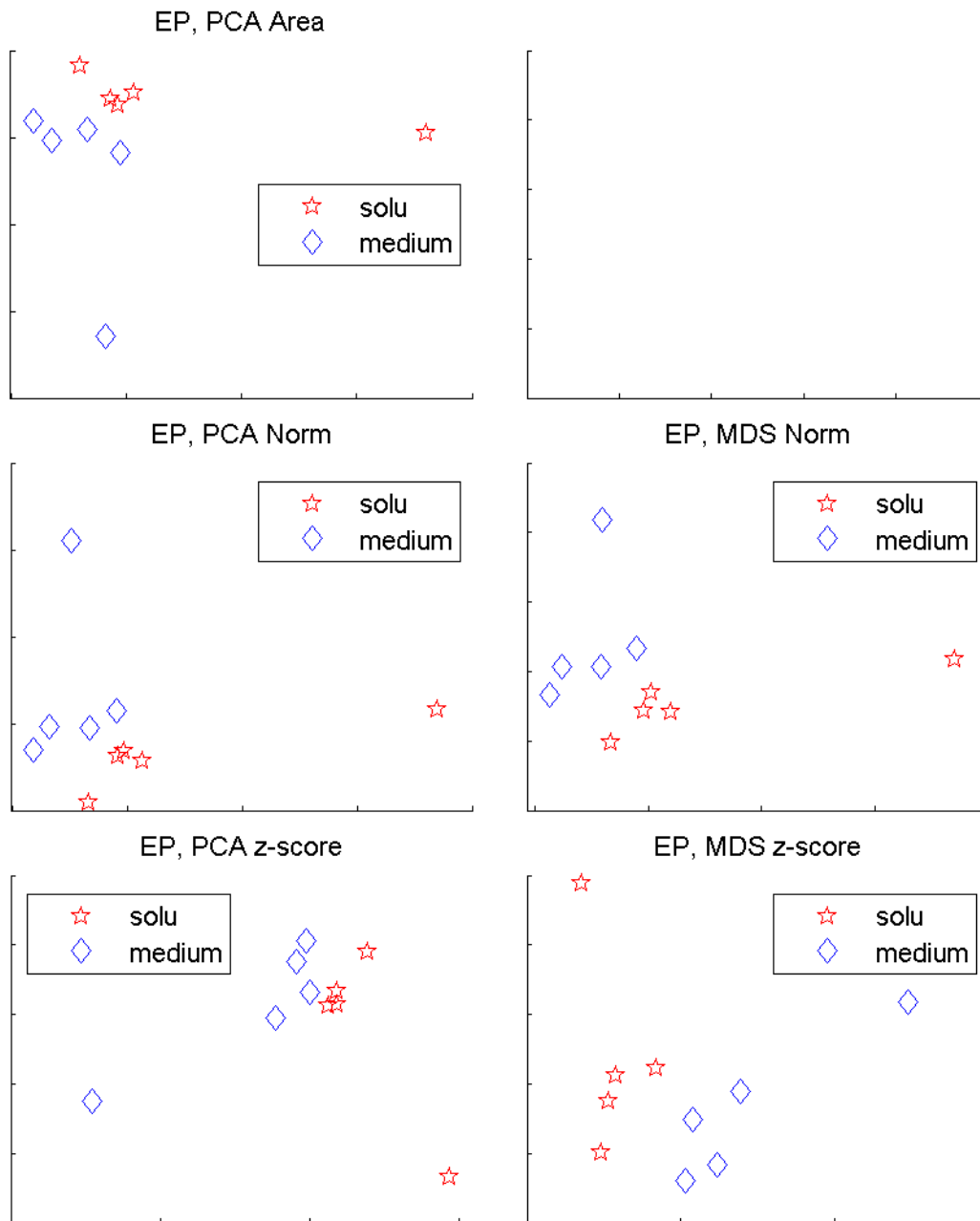


D	AREA		NORM		z-score	
	PCA	MDS	PCA	MDS	PCA	MDS
2	60	50	60	50	30	40
3	80	80	80	80	20	30
4	70	60	70	60	40	40
5	40	50	50	50	50	40
6	60	50	50	50	50	50
KA	62	58	62	58	38	32

Virheluokitteluprosentti on keskimäärin 52 (vaihteluväli 32-63 %) eli luokittelu ei onnistu. LNCaP -solujen ja niiden mediumin hajut eivät eroa toisistaan lainkaan 96 h kohdalla.



Hypoteesi 5b: EP-156T -solujen ja niiden mediumin hajut eroavat toisistaan 96 h kohdalla.



D	AREA		NORM		z-score	
	PCA	MDS	PCA	MDS	PCA	MDS
2	0	NA	0	0	0	0
3	10	NA	10	0	0	0
4	10	NA	0	0	0	0
5	0	NA	0	0	10	0
6	10	NA	10	10	10	10
KA	6	NA	4	2	4	2

Virheluokitteluprosentti on keskimäärin 4 (vaihteluväli 2-6 %) eli luokittelu onnistuu erinomaisesti. Hypoteesi on tosi. EP-156T -solujen ja niiden mediumin hajut eroavat 96 h kohdalla toisistaan.

## 6. Pohdinta

Tärkeimpänä tuloksena on, että terveet solut ja syöpäsolut eroavat toisistaan hajun perusteella. Ero on suurempi 0 h kohdalla kuin 96 h kuluttua. Toinen löydös oli, että molempien solulinjojen hajut eroavat mediumiensa hajusta 0 h kohdalla. Tulosten perusteella DENSPm muuttaa LNCaPin hajua, mutta hyvänlaatuisten EP-156T -solujen hajuun se ei vaikuta. Solujen mediumin haju ei näytä muuttuvan DENSPm:n vaikutuksesta.

Kuten aikaisemmin todettiin, syövässä solut ovat proliferaatiovaiheessa. Eturauhassyövässä arginaasin ja DAO:n pitoisuudet kasvavat. Molempien vaikutuksesta lisääntyvät alempiarvoiset polyamiinit, putreskiini ja spermiidiini. Spermiinin tuotanto kiihtyy vasta solun erikoistumisen myötä, syöpäsolu ei erikoistu ja näin ollen eturauhassyöpäsoluissa on matala spermiinipitoisuus. Terveissä soluissa (EP-156T) spermiinipitoisuus on korkea ja ylimäärä spermiiniä pumpataan aktiivisesti ulos solusta. Näin ollen DENSPm:n vaikutus solujen toimintaan ei ole todennäköisesti ole yhtä merkittävä kuin syöpäsoluihin. Syöpäsoluissa (LNCaP) spermiinipitoisuudet ovat lähtökohtaisesti matalia, jolloin DENSPm:n vaikutuksesta spermiinin määrä laskee niin matalaksi, että solu ei enää selviydy vaan ajautuu apoptoosiin. DENSPm:n vaikutuksesta runsaasti lisääntynyt SSAT-entsyymien toiminta saa aikaan myös vetyperoksidien lisääntymisen, joka oksidatiivisen stressin kautta tuhoaa solua ja saa aikaan lopulta apoptoottisen solukuoleman. On siis mahdollista, että DENSPm:n lisäyksen aiheuttama muutos LNCaP:n hajuun ilmentää apoptoosiin ja sytotoksisuuteen liittyviä muutoksia, jotka eivät EP-156T-soluissa ilmene, eikä niiden haju näin ollen muutu.

DENSPm:n lisääminen ei 96 tunnin viljelyn aikana muuttanut merkittävästi muuttanut mediumin hajua kummankaan solulinjan kohdalla, vaikka polyamiinien määrän mediumissa pitäisi lisääntyneen SSAT-aktiivisuuden vuoksi olla selvästi kohonnut. Tämä löydös ei tue hypoteesia polyamiineista ”syövän hajun” taustalla olevina molekyyleinä, vaan syöpään liittyvä haju selittyy todennäköisesti muilla tekijöillä.

Bartolazzin ym. tekemässä tutkimuksessa todettiin, että jokaisella kasvaintyyppillä on oma kemiallinen hajunsa (Bartolazzi ym. 2010). Koska tämän tutkimuksen tulokset eivät tue polyamiinien roolia ”syövän hajua” selittävinä molekyyleinä, on jatkossa syytä suunnata katse oksidatiiviseen stressiin ja apoptoosiin liittyviin pieniin, epäspesifeihin molekyyleihin.

## **7. Johtopäätökset**

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli tutkia elektronisella nenällä, eroavatko hyvän- ja pahanlaatuinen eturauhassolulinja toisistaan ja millaisia muutoksia DENSpm:n lisääminen 96 tunnin inkuboinnin ajaksi aiheuttaa soluihin ja niiden mediuimeihin. Saatujen tulosten perusteella DENSpm näyttää vaikuttavan pahanlaatuisen eturauhassolulinjan aineenvaihduntaan, mikä heijastuu solujen hajuun. Mediumin haju ei kuitenkaan muutu. Tämä viittaa siihen, että DENSpm:n polyamiinien ulospumppausta aiheuttava vaikutus ei ole suoraan hajumuutoksen takana ja näin ollen polyamiinit eivät tällä perusteella selitä solulinjojen hajueroa.

## 8. Lähteet

Bartolazzi A, Santonico M, Pennazza G, Martinelli E, Paolesse R, D'Amico A, Di Natale C. A sensor array and GC study about VOCs and cancer cells. Elsevier, Sensors and Actuators 2010; B146: 483–488.

Bettuzzi S, Davalli P, Astancolle S, Pinna C, Roncaglia R, Boraldi F, Tiozzo R, Sharrardc M, Corti A. Coordinate Changes of Polyamine metabolism regulatory proteins During the Cell Cycle of Normal Human Dermal Fibroblast. FEBS Lett, 1999; 1:18-22.

Casero RA Jr, Marton LJ. Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases. Nature reviews. 2007 May; 6:373-390.

D'Amico A, Bono R, Pennazza G, Santonico M, Mantini G, Bernabei M, Zarlenga M, Roscioni C, Martinelli E, Paolesse R, Di Natale C. Identification of melanoma with a gas sensor array. Skin Res Technol. 2008 May;14(2):226-236.

D'Amico A, Pennazza G, Santonico M, Martinelli E, Roscioni C, Galluccio G, Paolesse R, Di Natale C. An investigation on electronic nose diagnosis of lung cancer. Lung Cancer. 2010 May; 68(2):170–176.

Di Natale C, Macagnano A, Martinelli E, Paolesse R, D'Arcangelo G, Roscioni C, Finazzi-Agrò A, D'Amico A. Lung cancer identification by the analysis of breath by means of an array of non-selective gas sensors. Biosens Bioelectron. 2003 Sep;18(10):1209-1218.

Dragonieri S, Annema JT, Schot R, van der Schee MP, Spanevello A, Carratú P, Resta O, Rabe KF, Sterk PJ. An electronic nose in the discrimination of patients with non-small cell lung cancer and COPD. Lung Cancer. 2009 May;64(2):166-170.

Eisenberg T, Knauer H, Schauer A, Büttner S, Ruckenstuhl C, Carmona-Gutierrez D, Ring J, Schroeder S, Magnes C, Antonacci L, Fussi H, Deszcz L, Hartl R, Schraml E, Criollo A, Megalou E, Weiskopf D, Laun P, Heeren G, Breitenbach M, Grubeck-Loebenstien B, Herker E, Fahrenkrog B, Fröhlich KU, Sinner F, Tavernarakis N, Minois N, Kroemer G, Madeo F. Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. Nat Cell Biol. 2009 Nov; 11(11):1305-1314.

Gendron KB, Hockstein NG, Thaler ER, Vachani A, Hanson CW. In vitro discrimination of tumor cell lines with an electronic nose. Otolaryngol Head Neck Surg. 2007; 137(2):269-273.

Gerner EW, Meyskens FL Jr. Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. Nature Reviews. 2004 Oct; 4: 781-792.

Greenberg G, Haraway MM. Comparative Psychology: A Handbook. 1998:388.

van der Graaf M, Schipper RG, Oosterhof GO, Schalken JA, Verhofstad AA, Heerschap A. Proton MR-spectroscopy of prostatic tissue focused on the detection of spermine, possible biomarker of malignant behavior in prostate cancer. Magma 2000; 10(3): 153-159.

Harrison GA. Spermine in human tissues. Biochem. J. 1931; (25):1885–1892.

Hiramatsu K, Sugimoto M, Kamei S, Hoshino M, Kinoshita K, Iwasaki K, Kawakita M. Diagnostic and prognostic usefulness of N<sup>1</sup>,N<sup>8</sup>-diacetylspermidine and N<sup>1</sup>,N<sup>12</sup>-diacetylspermine in urine as

novel markers of malignancy. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1997; 123(10):539-545.

Hiramatsu K, Takahashi K, Yamaguchi T. N<sup>1</sup>,N<sup>12</sup>-Diacetylspermine as a sensitive and specific novel marker for early- and late-stage colorectal and breast cancers. *Clin Cancer Res*. 2005 Apr; 11:2986-2990.

Hölttä E. Polyamiinit ja solujen kasvu. *Duodecim*. 1990; 106:278-287.

Kawakita M, Hiramatsu K. Diacetylated derivatives of spermine and spermidine as novel promising tumor markers. *J Biochem*. 2006 Mar; 139(3):315-22.

Kee K, Foster BA, Merali S, Kramer DL, Hensen ML, Diegelman P, Kisiel N, Vujcic S, Mazurchuk RV, Porter CW. Activated polyamine catabolism depletes acetyl-CoAA pools and suppresses prostate tumor growth in TRAMP mice. *J Biol Chem*. 2004; 279(38): 40076-40083.

Kermany BG, Schiffman SS, Nagle HT. A novel method for reducing the dimensionality in a sensor array. *IEEE Trans Instr Meas*. 1998;47:728–741.

Kermany BG, Schiffman SS, Nagle HT. Using neural networks and genetic algorithms to enhance performance in an electronic nose. *IEEE Trans Biomed Eng*. 1999;46:429–439

Keskinen A, Elgun S, Yilmaz E. Possible implications of arginase and diamine oxidase in prostatic carcinoma. *Cancer Detect Prev*. 2001; 25(1):76-79.

Koide T, Sakai S, Kawada Y, Hara A, Sawada H. Detection of polyamines by a new enzymatic differential assay. (8) Studies on tissue polyamine concentrations in patients with genitourinary malignant diseases. *Hinyokika Kyo*. 1990; 36(10):1109-1116.

Kogan I, Goldfinger N, Milyavsky M, Cohen M, Shats I, Dobler G, Klocker H, Wasylyk B, Voller M, Aalders T, Schalken JA, Oren M, Rotter V. hTERT-Immortalized Prostate Epithelial and Stromal-Derived Cells: an Authentic In vitro Model for Differentiation and Carcinogenesis. *Cancer Res*. 2006 Apr;66: (7); 3531-3540.

Lesniak A, Walczak M, Jezierski T, Sacharczuk M, Gawkowski M, Jaszczak K. Canine Olfactory Receptor Gene Polymorphism and Its Relation to Odor Detection Performance by Sniffer Dogs. *Journal of heredity*, 2008; 99:518-527.

Machado RF, Laskowski D, Deffenderfer O, Burch T, Zheng S, Mazzone PJ, Mekhail T, Jennings C, Stoller JK, Pyle J, Duncan J, Dweik RA, Erzurum SC. Detection of lung cancer by sensor array analyses of exhaled breath.. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2005; 171(11):1286-1291.

Mi Z, Kramer DL, Miller JT, Bergeron RJ, Bernacki R, Porter CW. Human prostatic carcinoma cell lines display altered regulation of polyamine transport in response to polyamine analogs and inhibitors. *The Prostate*. 1998; 34:51-60.

Moinard C, Cynober L, de Bandt JP. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clinical nutrition* 2005; 24:184-197.

Nakayama Y, Takayuki T, Minagawa N, Yamaguchi K. The clinical usefulness of urinary N<sup>1</sup>,N<sup>12</sup>-diacetylspermine (DiAcSpm) levels as a tumor marker in patients with colorectal cancer, *Oncol Lett*. 2012 May; 3(5): 970–974.

Pegg AE: Perspectives in cancer research. Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth as a target for chemotherapy. *Cancer Res.* 1988; 48:751-774.

Pledgie A, Huang Y, Hacker A, Zhang Z, Woster PM, Davidson NE, Casero RA Jr. Spermine Oxidase SMO(PAOh1), not N<sup>1</sup>-acetyl polyamine oxidase PAO, is the primary source of cytotoxic H<sub>2</sub>H<sub>2n</sub> in polyamine analogue-treated Human breast cancer cell lines. *J Biol Chem.* 2005; 280:39843-39851.

Qutob SS, Proulx D, Mesak FM, Ng CE. Effects of N<sup>1</sup>,N<sup>13</sup>-diethylnorspermine (DENSpm) and X-radiation treatment on human colorectal tumor clones with varying x-radiation and drug responses. *Radial Res.* 2005 Apr; 163(4):357-363.

Roine A, Tolvanen M, Sipiläinen M, Kumpulainen P, Helenius MA, Lehtimäki T, Vepsäläinen J, Keinänen TA, Häkkinen MR, Koskimäki J, Veskimäe E, Tuokko A, Visakorpi T, Tammela TL, Sioris T, Paavonen T, Lekkala J, Helle H, Oksala NKJ.. Detection of smell print differences between nonmalignant and malignant prostate cells with an electronic nose. *Future Medicine.* 2012; 8(9), 1157-1165.

Roine A, Veskimäe E, Tuokko A, Kumpulainen P, Koskimäki J, Keinänen TA, Häkkinen M, Vepsäläinen J, Paavonen T, Lekkala J, Lehtimäki T, Tammela TL, Oksala NKJ. Detection of Prostate Cancer by an Electronic Nose: A Proof of Principle Study. *J Urology.* 2014 July 2014; 192(1):230–235.

Russo A, Piovani M, Clericuzio M, Lombardo L, Tabasso S, Chamy MC, Vidari G, Cardile V, Vita-Finzi P, Garbarino JA. Putrescine-1,4-dicinnamide from *Pholiota spumosa* (Basidiomycetes) inhibits cell growth of human prostate cancer cells. *Phytomedicine.* 2007; 14(2-3):185-191.

Röck F, Barsan N, Weimar U. Electronic nose: current status and future trends. *Chem Rev.* 2008;108:705-725.

Saunders FR, Wallace HM. On the natural chemoprevention of cancer. *Plant Physiology and Biochemistry.* 2010; 48:621-626.

Simon H-U, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* 2000; 5:415-418.

Soda K. The mechanisms by which polyamines accelerate tumor spread. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2011; 30:95.

Suomen syöpärekisteri: [www.cancer.fi/syoparekisteri](http://www.cancer.fi/syoparekisteri)

Tian Y, Wang S, Wang B, Zhang J, Jiang R, Zhang W. Overexpression of SSAT by DENSpm treatment induces cell detachment and apoptosis in glioblastoma. *Oncol Rep.* 2012 Apr; 27(4):1227-1232.

Teti D, Visalli M, McNair H. Analysis of polyamines as markers of (patho)physiological conditions. *J of Chromatography B* 2002; 781:107-149.

Thomas T, Balabhadrapathruni S, Gallo MA, Thomas TJ. Development of polyamine analogs as cancer therapeutic agents. *Oncol Res.* 2002; 13(3):123-135.

Turner APF, Magan N. Electronic noses and disease diagnostics. *Nature Reviews* volume 2. 2004 Feb; 161-166.

Wang J-Y, Casero RA. Polyamine cell signaling. Humana Press. 2006; 91-95.

Williams H, Pembroke A. Sniffer dogs in the melanoma clinic? *Lancet*. 1989 Apr; 8640:734.

Wilson AD, Manuela B. Advances in electronic nose technologies developed for biomedical applications. *Sensors* 11. 2011; 1105-1176.

Wolff AC, Armstrong DK, Fetting JH, Carducci MK, Riley CD, Bender JF, Casero RA Jr., Davidson NE. A phase II study of the polyamine analog N<sup>1</sup>,N<sup>11</sup>-diethylnorspermine (DENSpm) daily for five days every 21 days in patients with previously treated metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2003 Dec 1; 9:5922-5928.